Aus der Medizinischen Universitätsklinik Erlangen
Direktor: Professor Dr. med. N. Henning

Untersuchungen über den Serotoninstoffwechsel bei haematologischen Erkrankungen*)

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Friedrich-Alexander-Universität
zu
Erlangen

Vorgelegt von
Werner Ordnung
aus Nürnberg

*) D 29

1961 № 155

Herrn Prof. Dr. med. Norbert Henning

zum 65. Geburtstag gewidmet

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Referent: Prof. Dr. med. N. Henning

Dekan: Prof. Dr. med. G. Hegemann

Tag der mündlichen Prüfung: 24. Oktober 1961

SONDERDRUCK AUS

KLINISCHE WOCHENSCHRIFT

ORGAN DER GESELLSCHAFT
DEUTSCHER NATURFORSCHER UND ÄRZTE

HERAUSGEGEBEN VON

K. H. BAUER HEIDELBERG · **L. HEILMEYER** FREIBURG I. BR. · **K. LANG** MAINZ · **H. SCHWIEGK** MÜNCHEN

SPRINGER-VERLAG BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG UND J. F. BERGMANN MÜNCHEN

38. JAHRG., HEFT 8 (S. 405/06) 15. APRIL 1960

ZUM NACHWEIS DER 5-HYDROXYINDOLESSIGSÄURE IM HARN

Von

H. SCHÖN, W. ORDNUNG[1] und E. SCHMID

(Eingegangen am 3. Februar 1960)

[1] D 29.

Udenfriend u. Mitarb. haben 1955 eine Methode für die quantitative Bestimmung von 5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIE) im Harn angegeben. Nachdem diese Technik inzwischen allgemein angewandt worden war, erschien sie schon aus Gründen der Vergleichbarkeit der Resultate als die Methode der Wahl. Nachprüfungen erstrecken sich bisher auf die Farbreaktion bzw. auf die Messung des Absorptionsspektrums (Carcasona u. Mitarb.), jedoch scheint die von Udenfriend angegebene Rückgewinnung von zugesetzter HIE in Höhe von 85% bisher nicht systematisch nachgeprüft worden zu sein.

Im Hinblick auf zahlreiche noch offene Fragen des Serotonin-Stoffwechsels (vgl. die Übersichtsarbeiten von Erspamer, Dalgliesh, Lewis, Page, sowie Udenfriend) sollten zunächst Normalwerte der 5-Hydroxyindolessigsäure-Ausscheidung ermittelt werden. Um mit dem zur Verfügung stehenden Photometer (Eppendorf, Modell 1958) meßbare Extinktionen zu erhalten, mußten wir das einzusetzende Harnvolumen im Vergleich zur Udenfriendschen Arbeitsvorschrift vergrößern. Bei Nachprüfung des gesamten Arbeitsganges, konnten dabei nur 25—56% der dem Harn zugesetzten 5-HIE[1] wiedergewonnen werden.

Eine Ursache dieses nicht tragbaren Verlustes ist die Verwendung von Chloroform zur Extraktion der 2,4-Dinitrophenylhydrazone und des überschüssigen 2,4-Dinitrophenylhydrazins. Beim Zentrifugieren kommt es zur Bildung eines Drei-Phasen-Systems von extrahiertem Urin, Chloroform und einem Niederschlag (vermutlich Salze) des extrahierten Harns. In den Niederschlag gingen, möglicherweise in Abhängigkeit von der Menge chloroform-fällbarer Harnsubstanzen, wechselnde Mengen von HIE über. Von Einfluß auf die Wiedergewinnung zugesetzter HIE war außerdem die Dauer des Ausschüttelns. Die Wiedergewinnung war höher, wenn höchstens 1 min geschüttelt wurde, während nach 5—10 min Ausschütteln eine Emulsion entstand, bei der keine einwandfreie Trennung durch Zentrifugieren erreicht werden konnte. Auch bei kurzer Schütteldauer blieb jedoch HIE im Chloroform zurück und konnte zum Teil durch Nachextraktion des Chloroforms mit Wasser (10% bzw. 3% der Ausgangsmenge) rückgewonnen werden. Ein Teil des Verlustes von HIE geht ferner zu Lasten der anschließenden Ätherextraktion trotz Verwendung von peroxydfreiem Äthyläther[2] und wiederholten Ausschüttelns der Äthers mit Pufferlösung (Wiedergewinnung im Zusatzversuch, bei Zugabe der HIE vor der Ätherextraktion, zwi-

[1] Für die freundliche Überlassung einer Versuchsmenge von 5-HIE sind wir der Deutschen Hoffmann-La Roche AG., Grenzach, zu Dank verpflichtet.

[2] 200 g basisches Al_2O_3, Aktivitätsstufe I, pro Liter Äther.

schen 50 und 65%). Orientierende Versuche mit direkter Ätherextraktion des Harns (HANSON u. SERIN) führten ebenfalls nicht zu befriedigenden Ergebnissen.

Die Methode zur 5-Hydroxyindolessigsäurebestimmung nach UDENFRIEND wurde daher in folgender Weise modifiziert:

I. Reagentien

1. 0,3%ige Lösung von 2,4-Dinitrophenylhydrazin in 2 n HCl.
2. Essigsäureäthylester, über basischem Al_2O_3 aufbewahrt.
3. Natr. sulfuricum puriss. sicc.
4. Saures Al_2O_3, standardisiert nach BROCKMANN, Aktivitätsstufe V.
5. Phosphatpuffer p_H 8, m/3 (Haltbarkeit bei 10° C 7 Tage).
6. 0,1%ige Lösung von α-Nitroso-β-naphtol in Äthanol.
7. Nitrit-Reagens (25 ml 2 n H_2SO_4 und 1 ml 2,5%ige Lösung von $NaNO_2$, täglich frisch bereiten).

II. Methodik

1. Sammeln der 24 Std-Harnmenge. Zusatz von 5 ml konz. HCl. Kühl aufbewahren, vor Licht schützen.
2. 20 ml Harn mit 5 ml 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Lösung versetzen, 15 min schütteln.
3. 20 ml Essigsäureäthylester (vgl. LANGEMANN u. GÖRRE) hinzufügen, 10 min schütteln. Nachextraktion der wäßrigen Phase mit weiteren 20 ml Essigsäureäthylester.
4. Wäßrige Phase verwerfen, beide Essigsäureäthylester-Phasen vereinigen, Trocknen mit Natrium sulfuricum siccum.
5. Durchlaufen des getrockneten Essigsäureäthylester-Extraktes durch eine Säule mit 5 g saurem Al_2O_3 (Durchmesser 2,5 cm), 3maliges Nachspülen mit je 10 ml Essigsäureäthylester.
6. Ausschütteln des Essigsäureäthylester-Eluats mit 5 ml Phosphatpuffer für 15 min, 1—2mal nachextrahieren, getrennte Aufarbeitung dieser Eluate.
7. 4 ml der Pufferphase mit 1 ml α-Nitroso-β-naphtol-Reagens und 1 ml Nitrit-Reagens versetzen und 5 min bei 37° C inkubieren.
8. Pufferphase mit 5 ml Essigsäureäthylester zweimal ausschütteln. Verwerfen der Esterphasen.
9. Pufferphase zur Vermeidung von Trübungen durch Esterreste mit Pipette in 1 cm Cuvette einfüllen und gegen Leerwert (4 ml Puffer mit 1 ml Nitritreagens) bei 540 mμ colorimetrieren.

Berechnung. Ablesen der Extinktion aus der Eichkurve, Addition der Werte der Nach-Eluate, Multiplikation mit 1,25 und der Tagesharnmenge/20 = Ausscheidung an 5-HIE in mg/d.

Ergebnisse. In 10 Zusatzversuchen wurden zwischen 79,5 und 95%, im Mittel 83%, der dem Harn zugesetzten Mengen an HIE (5—20 μg/ml) wiedergewonnen. Die Tagesausscheidung an HIE lag bei 24 Versuchspersonen im Alter von 17 und 74 Jahren (13 Männer, 11 Frauen) zwischen 1 und 6 mg

und betrug im Mittel 2,53±1,11 mg/d[1]. Eine Altersabhängigkeit oder geschlechts-gebundene Unterschiede der HIE-Ausscheidung ließen sich bei dem relativ kleinen Kollektiv bisher nicht nachweisen. Es bestand ferner keine Korrelation zwischen Tagesmenge an HIE und Tagesharnvolumen. Über Untersuchungen der HIE-Ausscheidung von Patienten mit Erkrankungen des hämatopoetischen Systems, des Magendarmtraktes und der Leber wird an anderer Stelle berichtet.

Literatur. Anderson, J. A., M. R. Ziegler and D. Doeden: Science **127**, 236 (1958). — Carcasona, A., J. C. Cérvos-Navarro u. F. Unterharnscheidt: Klin. Wschr. **37**, 253 (1959). — Dalgliesh, C. E.: Advanc. Clin. Chem. **1**, 193 (1958). — Erspamer, V.: Arzneimittel-Forsch. 8, 571 (1958). — Hanson, A., and F. Serin: Lancet **1955/I**, 1216. — Honet, J. C., T. V. Casey and J. W. Runyan: New Engl. J. Med. **261**, 188 (1959). — Langemann, H., u. J. Goerre: Schweiz. med. Wschr. **1957**, 607. — Lewis, G. P.: 5-Hydroxytryptamine. London: Pergamon Press 1958. — Page, I. H.: Physiol. Rev. **34**, 563 (1954). — Udenfriend, S., H. Weissbach and C. T. Clark: J. biol. Chem. **215**, 337 (1955). — Udenfriend, S., H. Weissbach and B. B. Brodie: Methods of biochem. Analysis **6**, 95 (1958). — Waalkes, P. T., A. Sjoerdsma, C. R. Creveling, H. Weissbach and S. Udenfriend: Science **127**, 648 (1958).

---

[1] Auf Einführung eines Korrekturfaktors zum Ausgleich der Verluste bei der Aufarbeitung des Materials wurde verzichtet. Harn von Klinikpatienten, die medikamentös behandelt wurden, oder die in den letzten 48 Std Bananen genossen hatten (vgl. Anderson u. Mitarb., Honet u. a., Waalkes u. Mitarb.), kam nicht zur Untersuchung.

Druck der Universitätsdruckerei H. Stürtz AG., Würzburg

Lebenslauf

Name:	Werner Ordnung
Geburtstag:	3. Mai 1934
Geburtsort:	Schneidemühl
Religion:	Evangelisch
Elternnamen:	Heinrich und Elsbeth Ordnung
Beruf des Vaters:	Verwaltungsamtmann
Schulbesuch:	Volksschule Bayreuth Oberrealschule Bayreuth (Unter- und Mittelstufe) Dürer-Oberrealschule Nürnberg (Oberstufe)
Abschluß	Reifeprüfung, abgelegt am 15. Juli 1955 an der Dürer-Oberrealschule Nürnberg
Studium:	Friedrich-Alexander-Universität Erlangen — Med. Fakultät — Beginn am 1. November 1955 Physikum am 2. Mai 1958 an der gleichen Universität Das Staatsexamen habe ich im Frühjahr 1961 abgelegt.